

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ANDRÉ PARENTE DE BRITO BEZERRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FITOCONSTITUINTES CONTRA
CANDIDA ALBICANS.**

João Pessoa
2015

ANDRÉ PARENTE DE BRITO BEZERRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FITOCONSTITUINTES CONTRA
CANDIDA ALBICANS.**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado à banca avaliadora,
em cumprimento dos requisitos
necessários para a obtenção do
título de Bacharel em Farmácia,
pelo Centro de Ciências da
Saúde, Universidade Federal da
Paraíba.

Orientador: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa
2015

B574a

Bezerra, André Parente de Brito.

Avaliação da atividade antifúngica de fitoconstituintes contra *Candida albicans* / André Parente de Brito Bezerra - - João Pessoa: [s.n.], 2015.

39f. : il.

Orientadora: Edeltrudes de Oliveira Lima.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. *Candida albicans*. 2. Atividade antifúngica. 3. Fitoconstituintes.

BS/CCS/UFPB

CDU: 615(043.2)

ANDRÉ PARENTE DE BRITO BEZERRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FITOCONSTITUINTES CONTRA
CANDIDA ALBICANS.**

Aprovado em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima

Orientadora

Prof^o. Dr. Adalberto Coelho da Costa

Examinador

Me. Janiere Pereira de Sousa

Examinadora

João Pessoa
2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar sempre pelos caminhos certos.

À minha família, pelo apoio presente em todos os momentos.

À professora Edeltrudes de Oliveira Lima, pela excelente orientação em todos os momentos deste trabalho e durante toda a minha vida acadêmica na UFPB.

Aos meus amigos, por todo o apoio dado em todos os momentos.

A quem sempre esteve ao meu lado, ajudando nos momentos de dificuldade, de falta de ânimo, sempre me motivando a continuar firme.

A todos aqueles que de alguma forma tenham contribuído para a realização desse trabalho.

RESUMO

BEZERRA, A. P. B. **Avaliação da atividade antifúngica de fitoconstituintes contra *Candida albicans***. 39p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal da Paraíba, João pessoa, 2015.

As infecções oportunistas são um dos maiores problemas para pacientes imunocomprometidos, tendo em vista a alta predisposição desses indivíduos à essas infecções. Dentre os inúmeros micro-organismos que podem estar envolvidos nesse quadro, *Candida albicans* é a maior causa de infecções fúngicas em humanos. Esse fungo é um patógeno oportunista, que habita o corpo humano de forma comensal, podendo tornar-se patogênico em consequência a uma resposta imunológica do hospedeiro ou virulência da levedura. A resistência desses micro-organismos aos agentes terapêuticos disponíveis vem aumentando bastante, ressaltando a necessidade de busca de novos agentes com potencial antifúngico, como fitoconstituintes e outros produtos de origem natural. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi analisar a atividade antifúngica dos fitoconstituintes citral e geraniol sobre cepas de *Candida albicans*. Os ensaios realizados foram: o efeito dos fitoconstituintes sobre a cinética de crescimento fúngico, e a atividade dos mesmos sobre a micromorfologia de *C. albicans*. Na cinética de crescimento utilizando citral, foi observado um efeito fungicida (redução $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL a partir do inóculo inicial) para *C. albicans* ATCC 76485 e LM 70, a partir de 4 horas em uma concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$. Utilizando geraniol, o efeito fungicida para a cepa ATCC 76485 foi observado a partir de 2 horas, em uma concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$, e para a cepa LM 70, a partir de 4 horas, na mesma concentração. Os fitoconstituintes apresentaram redução na produção de pseudohifas e clamidoconídeos, fatores envolvidos na patogenicidade de *C. albicans*. Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que citral e geraniol apresentam considerável atividade antifúngica contra cepas de *C. albicans*, ressaltando a necessidade de estudos posteriores acerca da toxicidade, mecanismos de ação, testes *in vivo*, entre outros, para avaliar a possibilidade de elaboração de um medicamento com segurança e eficácia.

Palavras-Chave: *Candida albicans*. Atividade antifúngica. Fitoconstituintes.

ABSTRACT

BEZERRA, A. P. B. **Evaluation of antifungal activity of phytochemicals against *Candida albicans***. 39p. Work of Course Conclusion – Federal University of Paraiba, João pessoa, 2015.

Opportunistic infections are one of the major problems in immunocompromised patients, due to the high tendency by the patients to develop such infections. Amongst the large quantity of microorganisms, which might be infecting patients with immunologic disorders, *Candida albicans* is the most reported agent causing fungal infections in humans. This fungus is an opportunistic pathogen, which has been found in the human body as a commensal organism, it may become pathogenic as a result of patient's immunological responses or due to yeast's virulence. In addition, microorganism's resistance to the therapeutic agents is considerably increasing, so that, the necessity to develop new drugs with antifungal potential is also rising, for example phytochemicals and other products from the environment. Therefore, the goal of this project was to analyse the antifungal activity of the phytochemical components citral and geraniol on strains of *Candida albicans*. The tests realised where: the phytochemical's effect on the kinetic of the *C. albicans* growth and the activity of the composts on its micromorphology. Regarding to the kinetics of the fungal growth, a fungicide activity (reduction $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL from the initial inoculum) was observed utilizing citral on *C. albicans* ATCC 76485 and LM 70 strains, from 4 hours in a concentration of 64 $\mu\text{g/mL}$. On the other hand, utilizing geraniol, the fungicide effect on the strain ATCC76485 was observed from 2 hours, in a concentration of 32 $\mu\text{g/mL}$. To the LM 70 strain, fungicide effects appeared from 4 hours using the same concentration. The phytochemicals have shown reduction in the production of pseudohyphae and chlamydospores, which are factors involved in the pathogenic process of *C. albicans*. Regarding the results obtained, it can be conclude that citral and geraniol have presented considerable antifungal activity upon strains of *C. albicans*, highlighting the necessity of posterior studies about toxicity, mechanisms of action and *in vivo* tests, among others, in order to evaluate the possibility of developing drugs with security and efficacy.

Key-words: *Candida albicans*. Antifungal activity. Phytochemicals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Micromorfologia das principais leveduras do gênero <i>Candida</i>	14
Figura 2 - Alvos de drogas antifúngicas na parede celular, membrana e núcleo.....	18
Figura 3 – Estrutura química dos agentes poliênicos: Anfotericina B e Nistatina.....	19
Figura 4 – Estrutura química de alguns agentes azólicos.....	20
Figura 5 - Estrutura química da flucitosina.....	21
Figura 6 - Estrutura química da micafungina.....	22
Figura 7 – Efeito do Citral na cinética de crescimento fúngico de <i>Candida albicans</i>	28
Figura 8 - Efeito do Geraniol na cinética de crescimento fúngico de <i>Candida albicans</i>	29
Figura 9 - Efeito da Anfotericina B na cinética de crescimento fúngico de <i>Candida albicans</i>	29
Figura 10 - Efeito do citral, geraniol e anfotericina B sobre a micromorfologia de <i>C. albicans</i>	31
Figura 11 - Efeito do citral, geraniol e anfotericina B sobre a micromorfologia de <i>C. albicans</i>	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO CANDIDA	12
PATOGENIA E FATORES DE VIRULÊNCIA	15
AGENTES ANTIFÚNGICOS	17
PRODUTOS NATURAIS.....	22
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 Local da pesquisa	25
4.2 Fitoconstituintes e antifúngico padrão.....	25
4.3 Micro-organismos.....	25
4.4 Meios de cultura.....	25
4.5 Efeito sobre a cinética de crescimento fúngico	26
4.6 Efeito sobre a micromorfologia do fungo.....	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Efeito sobre a cinética de crescimento fúngico	28
5.2 Efeito sobre a micromorfologia do fungo.....	30
6 CONCLUSÕES	34

1 INTRODUÇÃO

Os fungos constituem a microbiota normal do homem, e devido a este fato, estão entre os micro-organismos mais frequentes em infecções hospitalares. As infecções fúngicas hospitalares tem se tornado de grande importância nos últimos anos, devido ao aumento progressivo e pelas altas taxas de morbi-mortalidade nos pacientes hospitalizados (COLOMBO, 2000).

Pacientes imunocomprometidos que são acometidos de infecções fúngicas oportunistas são cada vez mais frequentes. Nas últimas décadas sua incidência tem aumentado, pois a população em geral é mais exposta a fatores que favorecem a infecção micótica (KAUFFMAN, 2006; KHAN et al., 2010; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010). Os estudos mostram que a incidência de infecções oportunistas em ambientes hospitalares ou nosocomiais estão relacionadas com fungos pertencentes aos gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cryptococcus*, entre outros (HENNEQUIN, 1996).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Espécies de *Candida* colonizam normalmente a pele, boca, trato gastrointestinal e trato geniturinário. Entretanto, estes micro-organismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos imunológicos do indivíduo (DIGNANI; SOLOMKIN; ANAÏSSIE, 2003).

Candidíase é um problema clínico de importância crescente desde a década de 1950, devido à sua frequência e gravidade das suas complicações. Causa significativa mortalidade e morbidade em pacientes imunocomprometidos, tais como aidéticos e receptores de órgãos transplantados em terapia imunossupressora (JIN et al., 2010; SENEVIRATNE et al., 2008).

Os agentes etiológicos das infecções fúngicas, ao longo do tempo, podem adquirir resistência frente a ação dos agentes antifúngicos, tornando difícil o tratamento (ARAÚJO et al., 2004). A diminuição da susceptibilidade de espécies de *C. albicans* e não-*albicans* foi inicialmente relatada em 1970 em pacientes com candidíase mucocutânea crônica com repetidos e prolongados tratamentos (RAUTEMAA et al., 2007).

A utilização de produtos naturais para isolamento e caracterização físico-química de novas moléculas é uma das fontes para estudos biológicos relacionados à atividade antifúngica. A busca de novos agentes antifúngicos tem sido bastante extensiva, tanto de compostos químicos, como biológicos, e entre eles se encontram os fitoconstituintes, que por serem de origem natural, tem sido amplamente estudados.

Tendo em vista a alta incidência de casos de candidíase, juntamente com o aumento no número de pacientes imunocomprometidos e surgimento de cepas resistentes aos agentes antifúngicos disponíveis, é de fundamental importância a busca por novas moléculas com potencial antifúngico, sendo os fitoconstituintes uma excelente alternativa para esse propósito.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do estudo foi analisar a atividade antifúngica, *in vitro*, dos fitoconstituintes citral, geraniol e um antifúngico padrão, sobre cepas de *Candida albicans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a interferência dos produtos sobre a cinética de crescimento das cepas fúngicas;

2.2.2 Avaliar o efeito dos produtos sobre a micromorfologia das cepas fúngicas

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO *Candida*

De acordo com a taxonomia dividida em cinco reinos, o que engloba os fungos é o reino Fungi, o qual compreende leveduras, fungos filamentosos (bolors) e os fungos macroscópicos (cogumelos) (BURTON, ENGELKIRK, 2005).

Os fungos são seres eucarióticos, apresentando uma membrana nuclear que envolve o material nuclear como os cromossomos e o nucléolo. São classificados como organismos heterotróficos por serem desprovidos de pigmento fotossintetizante, e por aproveitar a energia contida nas ligações químicas de vários nutrientes. A composição bioquímica das células fúngicas é bastante variável, até mesmo dentro de uma mesma espécie, porém, apesar de diferenças tão marcantes, a concentração de DNA permanece constante (SIDRIM, ROCHA, 2004).

O interesse pelo estudo desses organismos é motivado pelo seu potencial fermentativo na produção de alimentos e antibióticos, pela sua biologia característica e fascinante, por poderem estabelecer relações com outros diversos seres vivos, e principalmente por serem patogênicos aos seres humanos em determinadas condições (ROMANI, 2011).

Dentre as várias espécies de fungos oportunistas que podem se apresentar patogênicos aos seres humanos, destacam-se as leveduras do gênero *Candida* (MARTINS et al., 2011; PARRILHA et al., 2011).

Os fungos pertencentes ao gênero *Candida* são fungos diploides e polimórficos, podendo apresentar estruturas leveduriformes hialinas, com formação de blastoconídios, pseudo-hifas e em algumas circunstâncias pode apresentar hifas verdadeiras. A característica macroscópica das colônias cultivadas em ágar Sabouraud é geralmente esbranquiçada e cremosa. Esse gênero abrange cerca de 200 espécies, pertence ao filo dos Ascomycetes, tendo em vista que a reprodução sexuada é caracterizada pela produção de ascos. São pertencentes à classe Blastomycetes, ordem Cryptococcaceae.

As leveduras do gênero *Candida* podem ser encontradas em diversos ecossistemas, incluindo solo, água, alimentos, e também fazendo parte da microbiota normal de animais e seres humanos. Estes micro-organismos degradam proteínas e carboidratos para obtenção de carbono e nitrogênio, que são elementos fundamentais para seu desenvolvimento.

Na maioria das vezes, as leveduras se reproduzem de maneira assexuada, através de estruturas denominadas conídios, mas algumas espécies podem se desenvolver de forma sexuada. Devido a sua capacidade adaptativa, podem se desenvolver tanto na presença de oxigênio quanto em condições anaeróbias (LACAZ et al., 2002; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010; SIDRIM; ROCHA, 2004).

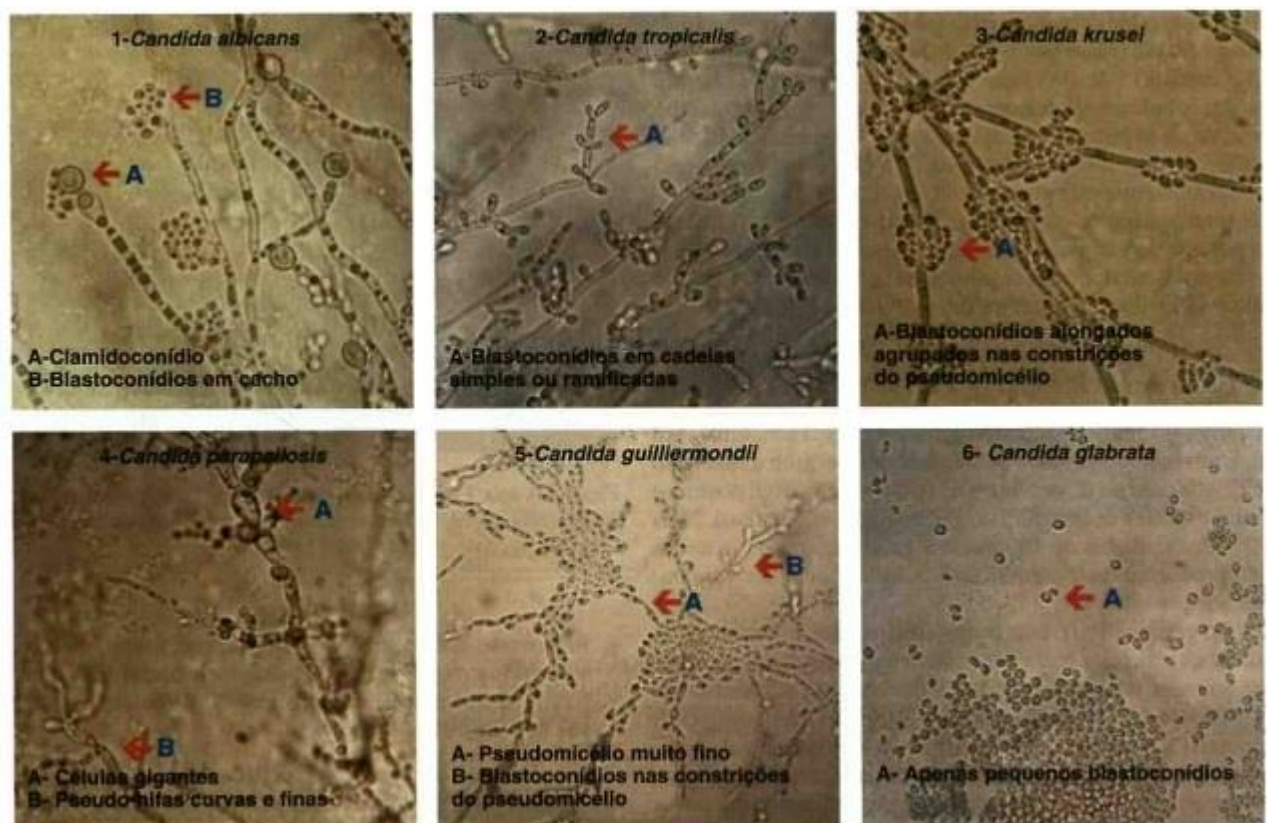
O comensalismo é uma relação comum entre leveduras do gênero *Candida* e seres humanos, onde estes colonizam primariamente o trato gastrointestinal, fazendo parte também da microbiota da vagina, uretra, pulmões e cavidade oral. Porém esses micro-organismos podem se tornar patogênicos em casos onde ocorre alteração dos mecanismos de defesa do hospedeiro (extremos de idade, doenças de base, imunossupressão), ou perda da integridade das barreiras anatômicas, como queimaduras, pacientes em uso de cateteres ou cirurgias invasivas.

Dentre os processos infecciosos causados por leveduras do gênero *Candida*, *C. albicans* é considerada a principal levedura patogênica oportunista, tendo em vista que é frequentemente isoladas em humanos, entretanto, outras espécies denominadas de não-*albicans*, tem mostrado aumento relevante nas últimas décadas: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. guilliermondi*, *C. lusitaniae*, *C. ciferrii*, *C. haemulonii*, *C. lipolytica*, *C. pulcherrima*, *C. catenulata*, *C. utilis*, *C. viswanathii* e *C. zeylanoides* (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A identificação das espécies do gênero *Candida* em infecções é de grande importância, visto que as espécies não-*albicans* tem se mostrado relevantes nos processos infecciosos, e a patogenicidade e o perfil de sensibilidade aos antifúngicos é variável entre as espécies. Essa identificação também é necessária para caracterização epidemiológica das espécies patogênicas e investigação de surtos de infecção (MIMICA et al., 2009).

A identificação de espécies do gênero *Candida* leva em consideração vários fatores, como a morfologia, produção de tubo germinativo, assimilação de carboidratos e nitrogênio, e fermentação de carboidratos. No teste de microcultivo, essas leveduras caracterizam-se pela produção de pseudo-hifa e/ou hifas verdadeiras. A espécie *C. albicans* além da produção de blastoconídeos e pseudo-hifas, também pode produzir clamidoconídeos, como mostra a figura 1, e são definidos como estruturas de resistência. Para a identificação de espécies de *Candida* também podem ser utilizados meios cromogênicos como o CHROmagar, que se baseiam na produção de cor nas colônias por reações enzimáticas espécie-específicas, facilitando a identificação presuntiva e o reconhecimento de colônias mistas (LACAZ et al., 2002; SIDRIM, ROCHA, 2004).

Figura 1 – Micromorfologia das principais leveduras do gênero *Candida*.



Fonte: SIDRIM, ROCHA, 2004

As infecções por *Candida* podem ser divididas em dois grupos, de acordo com o local em que há a infecção. As candidíases superficiais, em que as lesões atingem tecido cutâneo, mucoso (orofaringe, intestino ou vagina), unhas e periungueais, e as candidíases profundas, que atingem órgãos internos dos aparelhos e sistemas (MORAES, 2008).

PATOGENIA E FATORES DE VIRULÊNCIA

As leveduras do gênero *Candida* são encontradas em diversos sítios anatômicos do homem, estabelecendo relação de comensalismo com esse hospedeiro. Diversos fatores estão envolvidos na quebra de equilíbrio dessa relação não-patogênica, podendo ocasionar o aparecimento de uma relação de parasitismo, gerando infecções com diferentes níveis de gravidade.

As infecções fúngicas oportunistas, especialmente as invasivas, têm se tornado um grande problema de saúde pública, e vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas. Essas infecções se desenvolvem principalmente em pacientes que encontram-se com o sistema imune comprometido, incluindo pacientes com HIV, leucemia aguda, neutropênicos, e pacientes que realizaram transplante. Também podem ser citados outros fatores predisponentes ao aparecimento de infecções oportunistas, como uso de antibióticos de amplo espectro, doenças de base, procedimentos invasivos (cirurgias, cateterismo, implantação de próteses), uso de anticoncepcionais orais de alta dose, citostáticos, e alguns estados fisiológicos do hospedeiro (KAUFFMAN, 2006). Porém, também existem alguns fatores inerentes ao micro-organismo que facilitam a instalação de uma infecção e caracterizam os diferentes níveis de patogenicidade entre as espécies, incluindo a adesão às células epiteliais, formação de biofilme, dimorfismo e produção de enzimas extracelulares.

Aderência

A colonização de micro-organismos que causam infecção passa primariamente pelo processo de adesão à superfície tecidual, caracterizando o primeiro estágio da patogênese. *Candida albicans* é capaz de aderir a células

epiteliais bucal, vaginal e intestinal como também a cateteres, implantes dentários ou articulações artificiais (SOUTHERN et al., 2008). Substâncias conhecidas como adesinas estão presentes na parede celular de *Candida*, facilitando sua adesão. Durante esse processo de aderência, *C. albicans* se mostra mais aderente que *C. tropicalis*, seguida por *C. parapsilosis* (CALDERONE; FONZI, 2001; DIGNANI; SLOMKIN; ANAÏSSIE, 2009).

Dimorfismo

A capacidade de *Candida* de alternância da forma leveduriforme para a forma filamentosa é denominada dimorfismo. Algumas espécies como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* podem ser encontradas na forma filamentosa, mas apenas as duas últimas possuem a capacidade de formar hifas verdadeiras (DIGNANI et al., 2009). *C. albicans* pode alterar sua morfologia de levedura para hifa em resposta a condições ambientais, mas a forma de blastoconídios predomina em meio rico em nutrientes, enquanto os filamentos são formados em meios escassos destes. Essa característica dimórfica é determinante para a patogenicidade deste fungo e é importante para uma maior interação com o hospedeiro, permitindo a colonização com maior facilidade. Alguns agentes antifúngicos têm efeitos na morfologia fúngica, como a anfotericina B, que inibe o crescimento da forma filamentosa, enquanto os derivados azólicos podem fazer com que as células fúngicas fiquem agrupadas ou formem brotamentos com alterações estruturais (COSTA, 2009).

Formação de biofilme

Candida spp. tem a capacidade de se desenvolver em condições fisiológicas extremas, bem como de pH e nutrientes. Devido a essa capacidade, pode ocorrer a aderência sob diversas superfícies, formando comunidades de micro-organismos conhecidas como biofilmes. Biofilmes formados por espécies de *Candida* podem se desenvolver sob superfícies naturais ou de dispositivos médicos como o catéter. A formação desses biofilmes pode facilitar infecções, visto que estes são diferentes fenotipicamente da sua “forma livre” e apresentam elevada resistência aos

mecanismos de defesa do hospedeiro e aos agentes terapêuticos utilizados (HASAN et al., 2009).

Produção de enzimas extracelulares

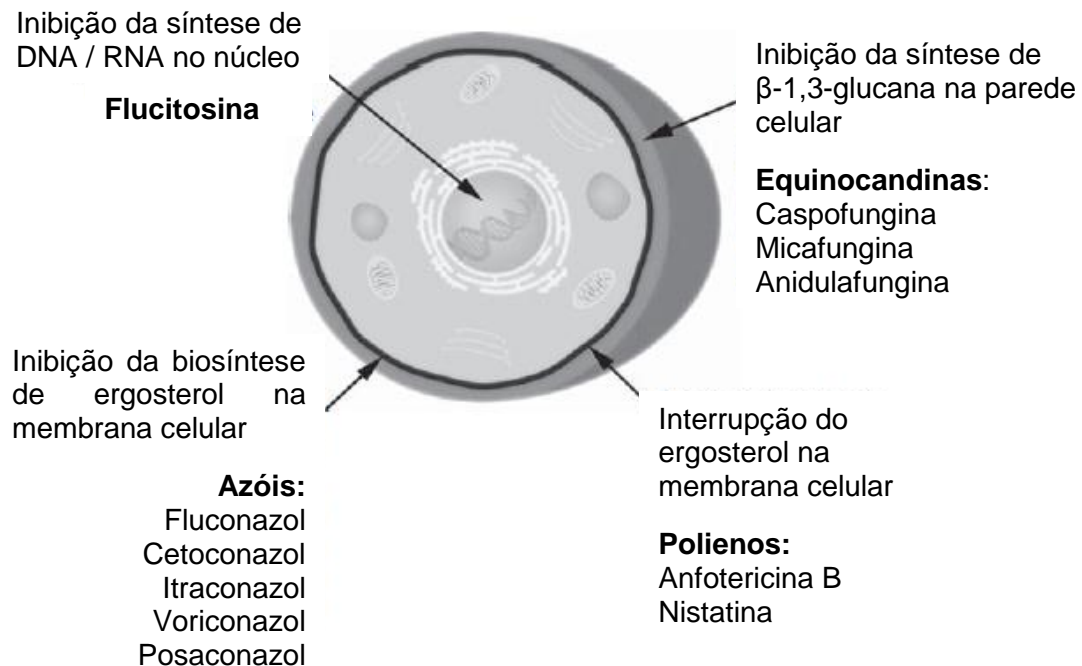
A produção de enzimas extracelulares como proteases, fosfolipases, lipases, são importantes fatores de virulência de *Candida* spp. As proteinases geralmente estão envolvidas com vários processos, como a formação de pseudo-hifa e aderência, além da degradação de importantes proteínas como albumina, hemoglobina, queratina, colágeno, mucina, lactoferrina, e imunoglobulinas, que contribuem bastante para a patogenicidade das leveduras. As enzimas mais estudadas são as Secretoras Aspartil Proteinases (SAPs). Essas enzimas produzem proteólise não específica de proteínas do hospedeiro envolvidas nos mecanismos de defesa (DIGNANI; SLOMKIN; ANAÏSSIE, 2009).

Fosfolipases geralmente atuam sobre fosfolipídios de membrana. A ação dessa classe de enzimas sobre as membranas do hospedeiro danifica seus componentes lipídicos, desestruturando as barreiras físicas e facilitando à adesão nas células (COSTA, 2009).

AGENTES ANTIFÚNGICOS

O número de drogas antifúngicas disponíveis atualmente para o tratamento da candidíase é limitado. Os agentes terapêuticos podem ser divididos principalmente em dois grupos: o primeiro, os antibióticos antifúngicos que ocorrem naturalmente, tais como os polienos e as equinocandinas, e o segundo, os fármacos sintéticos, incluindo os azóis e as pirimidinas fluoradas (RANG et al., 2007). Esses agentes atuam principalmente na parede celular, membrana e núcleo da célula fúngica, como mostra a figura 2.

Figura 2 - Alvos de drogas antifúngicas na parede celular, membrana e núcleo



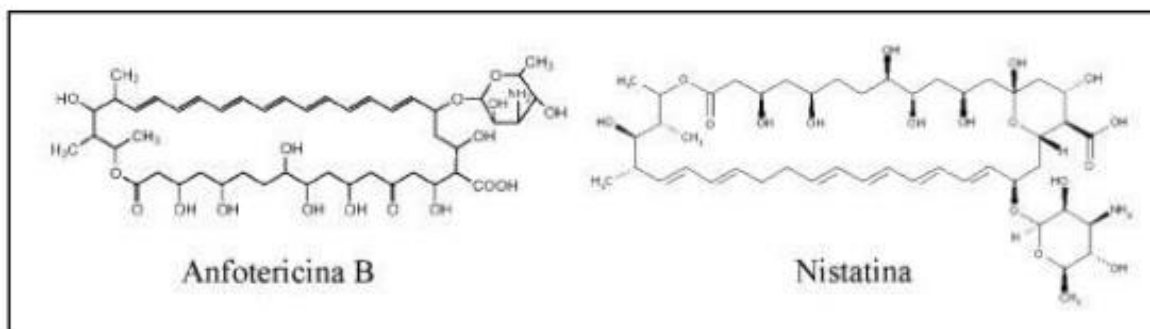
Adaptado de CHANDRASEKAR, 2011.

Um fator primordial no tratamento das micoses é eliminar os fatores predisponentes, fato que por vezes não é possível, como em doenças como câncer, leucemia, linfoma, AIDS e diabetes. Tendo em vista a crescente resistência que os fungos adquirem aos agentes terapêuticos, a realização de testes de sensibilidade é muito importante, e devem ser realizados, se possível, antes do início do tratamento (LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010).

A escolha do agente terapêutico ideal, bem como sua formulação, é determinado a partir do quadro clínico desenvolvido pelo paciente, juntamente com a susceptibilidade do agente causador, a existência de medicamentos de uso endovenoso e oral, interações medicamentosas e o custo do tratamento (MARTINEZ, 2006).

Os polienos representam a mais antiga família de fármacos antifúngicos, e foram introduzidos em 1950 (MOHR et al., 2008; MATHEW, NATH, 2009). Do grande grupo de polienos, as duas drogas mais usadas clinicamente são anfotericina B e nistatina, que apresentam o mesmo mecanismo de ação, e estrutura química semelhantes (RANG et al., 2007), como mostra a figura 3.

Figura 3 – Estrutura química dos agentes poliênicos: Anfotericina B e Nistatina



Adaptado de ODDS, 2003.

Os macrolídeos poliênicos apresentam atividade fungicida para a maioria das espécies de *Candida*, mostrando-se como eficientes agentes antifúngicos, além de apresentarem uma longa história de uso com baixa incidência de resistência. Porém, a sua utilização na terapêutica é limitada, devido à baixa solubilidade e pouca seletividade, causando toxicidade significativa (BORGOS et al., 2006; CHANDRASEKAR, 2011).

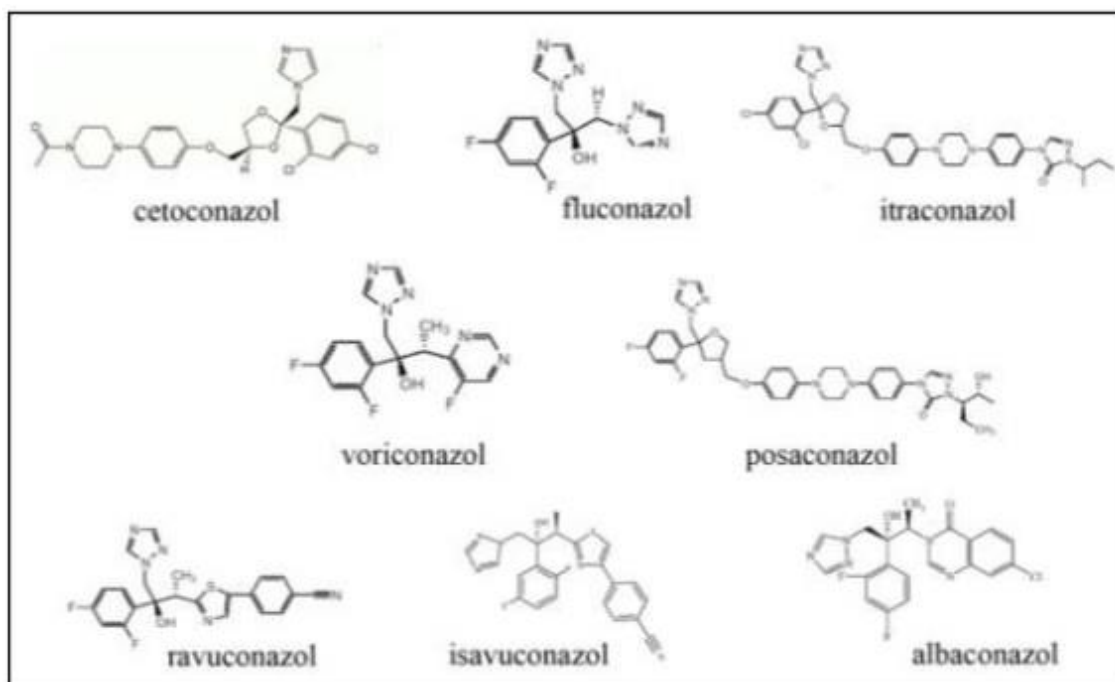
Os agentes poliênicos são moléculas anfipáticas que formam um complexo com o ergosterol, componente essencial para a membrana citoplasmática fúngica, ocasionando a formação de poros na membrana. Esse processo gera um desequilíbrio nas concentrações de componentes celulares, incluindo proteínas e cátions monovalentes e divalentes, afetando o equilíbrio osmótico da célula fúngica, levando a perda do potencial de membrana e morte celular (CHANDRASEKAR, 2011; MATHEW, NATH, 2009).

Os antifúngicos azólicos mais empregados atualmente no tratamento das candidíases incluem os imidazóis (cetoconazol e miconazol), triazóis de 1ª geração (fluconazol e itraconazol) e de 2ª geração (voriconazol, posaconazol, ravuconazol) (CHEN, SOBEL, 2005). Os imidazóis diferem estruturalmente dos triazóis na quantidade de átomos de nitrogênio presente no anel azólico composto por 5 membros, possuindo dois ou três átomos desse elemento.

Os imidazóis surgiram na década de 1980, sendo os primeiros agentes azólicos a serem lançados no mercado. Os mais comuns são cetoconazol e miconazol, que na época foram considerados medicamentos muito promissores para o tratamento das infecções sistêmicas, mas atualmente são mais utilizados em

apresentações tópicas e orais. Os triazóis surgiram na década de 1990, aumentando a especificidade de ligação no citocromo P450 do fungo. Os triazóis de primeira geração são o fluconazol e o itraconazol, e os de segunda são o voriconazol e posaconazol, originados de uma modificação estrutural dos triazóis de primeira geração (ODDS et al., 2003; PASQUALOTTO; DENNING, 2008), como mostra a figura 4.

Figura 4 – Estrutura química de alguns agentes azólicos

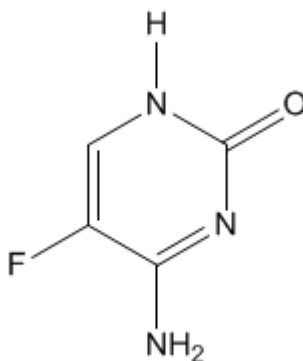


Adaptado de PASQUALOTTO; DENNING, 2008

Os azóis atuam na biossíntese do ergosterol, principal derivado esteroide presente na membrana celular fúngica. A interrupção se dá por meio da inibição da 14- α -desmetilase, a qual é uma enzima do citocromo P450, que catalisa a reação de oxidação do grupo 14- α -metil do lanosterol. Isso acarreta na interrupção da síntese de ergosterol e acúmulo de lanosterol, causando interferência no arranjo dos lipídeos de membrana. Esse processo compromete determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, inibindo o crescimento e a replicação fúngica (BENNETT, 2006).

A flucitosina (5-fluorocitosina) é um análogo de pirimidina e um antimetabólito, com a fórmula estrutural mostrada na figura 5.

Figura 5 - Estrutura química da flucitosina



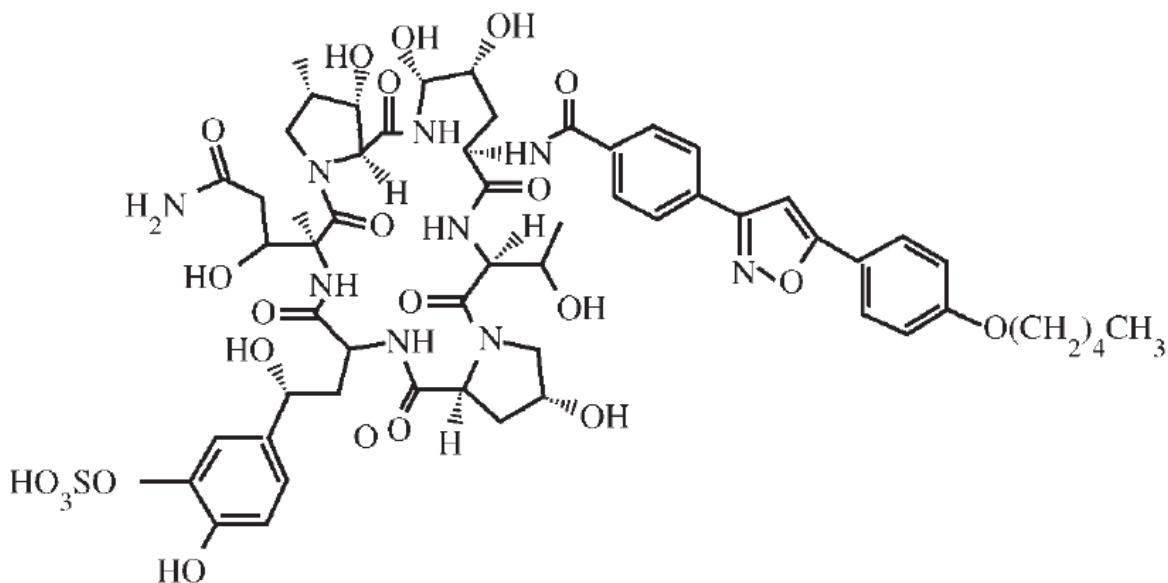
Fonte: BENNETT, 2006.

A flucitosina é um agente antifúngico oral, disponível desde 1971, mas não possui grande uso pela população, quando usada isoladamente, por ter um espectro de ação limitado e toxicidade considerável, além da facilidade dos micro-organismos de desenvolverem mecanismos de resistência (WILSON; DREW; PERFECT, 2009), de forma que sua utilização basicamente está envolvida em uma associação sinérgica com a anfotericina, eventualmente utilizada em infecções sistêmicas graves (RANG et al., 2007).

A 5-fluorocitosina atua na inibição da síntese de ácidos nucleicos na célula fúngica. Esse processo ocorre devido à sua conversão em 5-fluoroacil, realizada por determinadas enzimas que o fungo possui. Esse metabólito tem a capacidade de se incorporar ao RNA ou agir sobre a timidilato sintase, inibindo a síntese de DNA e ocasionando a morte da célula. Muitos fungos filamentosos não possuem as enzimas que realizam a conversão da 5-fluorocitosina em 5-fluoroacil, limitando o uso desse antifúngico a leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus neoformans* (MATHEW; NATH, 2009).

As equinocandinas fazem parte da classe de antifúngicos mais recente, incluindo a micafungina (estrutura mostrada na figura 6), caspofungina e anidulafungina (MOHR et al., 2008).

Figura 6 - Estrutura química da micafungina.



Fonte: PASQUALOTTO, DENNING, 2008.

O mecanismo de ação das equinocandinas se dá através da inibição da síntese de β -1,3-D-glucano, importante glicoproteína da parede celular fúngica, resultando na perda da integridade e conduzindo à lise celular (MOHR et al., 2008). Os três fármacos representantes das equinocandinas possuem espectro de ação semelhante, porém sua atividade contra determinadas espécies de fungos é um tanto variável. Sua atividade é restrita ao tratamento de candidíases e aspergiloses, visto que possuem pouca atividade frente a fungos do gênero *Fusarium*, *Scedosporium*, *Coccidioides*, *Blastomyces* e *Histoplasma*, enquanto *Zigomicetos*, *Trichosporum* spp. e *Cryptococcus* spp. são naturalmente resistentes (BAL, 2010).

PRODUTOS NATURAIS

As plantas constituem uma das mais importantes fontes de drogas com potencial medicinal, e podem contribuir efetivamente para a busca de novos produtos bioativos. A diversidade molecular de produtos de origem vegetal é muito superior aos produtos obtidos através de síntese, proporcionando uma maior possibilidade de elaboração de novos fármacos com funções terapêuticas diversificadas (BARBOSA-FILHO et al., 2007; USTULIN et al., 2009).

É observado um crescente interesse com relação aos fitomedicamentos, visto que esses apresentam diversas vantagens, quando comparados com os agentes terapêuticos convencionais, como a menor incidência de efeitos colaterais, toxicidade relativamente diminuída, baixo custo e no fato do Brasil ser um país com uma imensa biodiversidade. Pesquisas realizadas nas universidades brasileiras já identificaram mais de 350 mil espécies vegetais, mostrando que há um grande potencial de produtos naturais que podem ser destinados a uso medicinal (MARTINS, 2009).

Os componentes químicos existentes nos vegetais podem ser divididos em dois grupos principais. Os primeiros são os metabólitos primários (macromoléculas), que são essenciais a todos os seres vivos, os quais incluem os lipídios, carboidratos e proteínas. Esses componentes, através de rotas biossintéticas, em sua maior parte desconhecidas, originam o segundo grupo de compostos químicos, denominados metabólitos secundários, que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, e bioatividade, são encontrados em concentrações menores quando comparados aos metabólitos primários (POSER; MENTZ, 2004).

Os compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas são originados de duas rotas metabólicas principais que são derivadas da glicose: a do ácido chiquímico e a do acetado. O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides, compostos que apresentam anel aromático na sua composição. Os derivados da via do acetato são aminoácidos alifáticos, terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos (BAKKALI et al., 2008).

Durante a evolução das espécies, fungos patogênicos geraram uma intensa pressão seletiva sobre diversas espécies de plantas, fazendo com que estas desenvolvessem uma ampla variedade de compostos fitoquímicos com atividade antifúngica, fato que tem sido demonstrado pelas várias pesquisas de isolamento de componentes bioativos (SILVA et al., 2005).

Tendo em vista a crescente importância clínica e epidemiológica aplicada às infecções fúngicas e as limitações dos agentes terapêuticos existentes, há uma necessidade muito grande de desenvolvimento de novas alternativas, mais eficientes e com menor toxicidade, para o tratamento dessas infecções. A busca de

novos compostos bioativos a partir de produtos naturais continua sendo um tema de grande importância no cenário mundial, visto que os mecanismos de resistência são bastante recorrentes e nos remetem que a necessidade de novos alvos e novos agentes continuarão sendo requeridos (ODDS et al., 2003).

4 METODOLOGIA

4.1 Local da pesquisa

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Período: agosto a dezembro de 2014.

4.2 Fitoconstituintes e antifúngico padrão

Os fitoconstituintes utilizados nesta pesquisa foram citral e geraniol, juntamente com o antifúngico padrão Anfotericina B, utilizado como controle positivo. Todos foram adquiridos da Sigma-Aldrich® /USA.

4.3 Micro-organismos

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram selecionadas duas cepas de *Candida albicans*, sendo uma cepa padrão ATCC e outra clínica, sendo codificadas como (ATCC-76485 e LM-70).

4.4 Meios de cultura

Para o ensaio sobre a cinética de crescimento fúngico foram utilizados, o meio sólido ágar Sabouraud dextrose - ASD e caldo Sabouraud dextrose - CSD (Difco Laboratories®, USA), e ágar-fubá (Himédia, Índia) para o ensaio de micromorfologia, preparados conforme as instruções do fabricante.

Os meios de cultura foram solubilizados em água destilada e esterilizados por autoclavação, a 121°C, 1,0 atm por 15 minutos, de acordo com as instruções do fabricante.

4.5 Efeito sobre a cinética de crescimento fúngico

O estudo da interferência do citral, geraniol e anfotericina B sobre a curva de tempo de morte das cepas fúngicas foi realizado utilizando a metodologia descrita por Klepser et al. (1997, 1998), por meio do método de contagem de UFC. Neste ensaio, foi observado o comportamento das cepas de leveduras selecionadas ao longo de 24 h. Inicialmente, foi preparado o inóculo fúngico em solução salina a 0,85%, de aproximadamente 10^6 UFC/mL, padronizado conforme a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland.

Preparou-se uma série de tubos de ensaio esterilizados, onde foram adicionados 4,5 mL de CSD, contendo concentrações variadas dos produtos-teste (CIM/2, CIM e CIMx2). Em seguida, foram adicionados 0,5 mL da suspensão de leveduras em cada tubo. Também foi realizado o experimento controle correspondente, na ausência de fitoconstituintes e antifúngico sintético (tubo com 0,5 mL da suspensão de leveduras + 4,5 mL de CSD). Todo o sistema permaneceu incubado a 35-37°C por até 24 horas, no decorrer do ensaio.

Nos intervalos 0 h, 2 h, 4 h, 6 h e 24 h de exposição, uma alíquota de 1 µL dos tubos contendo as soluções testes foi retirada com o auxílio de uma alça calibrada e esterilizada, e uniformemente semeada na superfície de placas de Petri contendo ASD. As placas inoculadas foram incubadas a 35-37°C durante 24- 48 horas.

As curvas foram construídas plotando a contagem média de colônias (\log_{10} UFC/mL) em função do tempo de incubação (horas) com o GraphPad Prism. Foi considerada atividade fungicida do produto quando houve redução no crescimento $\geq 3 \log_{10}$ em UFC/mL, resultando em cerca de 99,9% de redução das UFC/mL, a partir do inóculo inicial. Já a atividade fungistática quando houve redução no crescimento $< 3 \log_{10}$ ($< 99,9\%$) UFC/mL. O experimento foi realizado em duplicata.

4.6 Efeito sobre a micromorfologia do fungo

Para o estudo de possíveis alterações na micromorfologia de *C. albicans* foi empregada a técnica de microcultivo em lâmina em placa de Petri- câmara úmida (Dalmau, 1929). O meio de cultura ágar-fubá com Tween 80 fundido foi fracionado em tubos estéreis contendo fitoconstituintes ou antifúngicos, em concentração correspondente a CIM e CIMx2 dos produtos, respectivamente. Também foi utilizado um tubo para controle do micro-organismo, apenas com o meio de cultura e a levedura. Após homogeneização, cada meio de cultura foi espalhado sobre uma lâmina de vidro.

Em seguida, partindo-se de repiques recentes, cultivados a 35°C durante 24-48 h em ASD, as leveduras foram semeadas em forma de estria sobre o meio de cultura. O sistema de ensaio foi incubado a 35°C por 24-48 h. Após o tempo de incubação adequado, as lâminas foram analisadas por microscopia óptica, em um aumento de 400x, em que foi observada a formação ou não de estruturas características como blastoconídios, pseudo-hifas e clamidoconídios.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

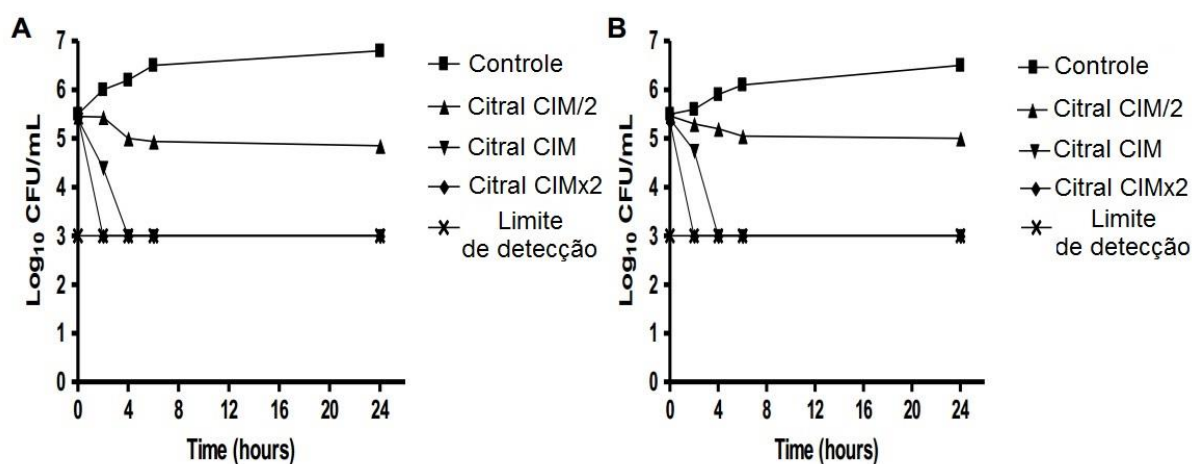
Para os testes realizados nesse estudo, foram utilizados os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos em estudos anteriores, em que o citral apresentou CIM de 64 $\mu\text{g/mL}$, geraniol de 16 $\mu\text{g/mL}$ e anfotericina B de 2 $\mu\text{g/mL}$.

5.1 Efeito sobre a cinética de crescimento fúngico

Duas cepas de *Candida albicans* (ATCC 76485, LM-70) foram submetidas ao teste de cinética de morte microbiana. Esse teste realiza uma contagem de número de unidades formadoras de colônias por mL, verificando se o produto testado tem ação fungicida ou fungistática, além de analisar a interação entre o produto e o micro-organismo, a fim de caracterizar uma relação dinâmica entre a concentração e a atividade ao longo do tempo.

Os gráficos da figura 7 mostram o Log₁₀ de UFC/mL em função do tempo de exposição aos fitoconstituintes em diferentes concentrações.

Figura 7 – Efeito do citral na cinética de crescimento fúngico de *Candida albicans*: ATCC 76485 (A) e LM-70 (B).

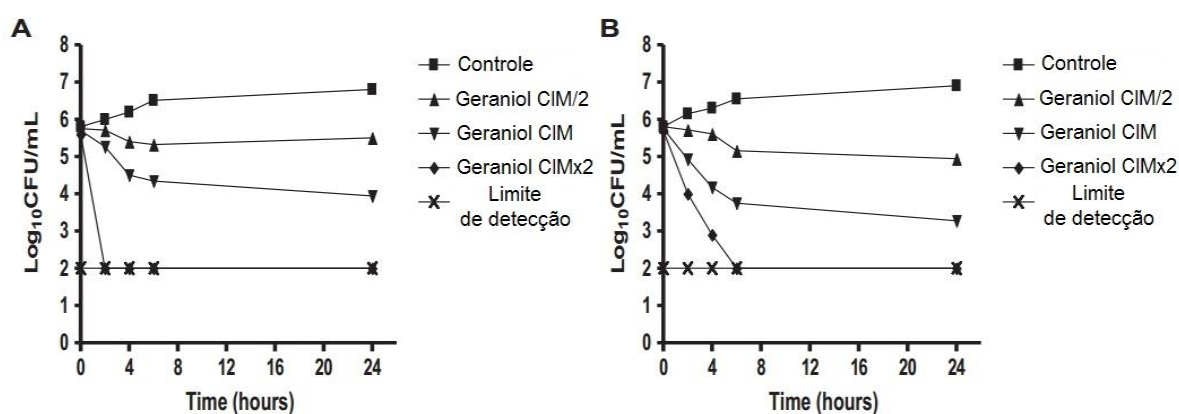


A figura 7 mostra que o citral na CIM/2 apresenta efeito fungistático, visto que houve uma redução menor que 3 Log₁₀ UFC/mL. Esse comportamento também foi observado na CIM até duas horas de exposição. À partir de quatro horas de exposição, a CIM e CIMx2 já apresentam efeito fungicida (redução acima de 3

Log10 de UFC/mL, A partir daí pode-se observar na cinética de morte uma variação de efeito fungistático do citral para efeito fungicida.

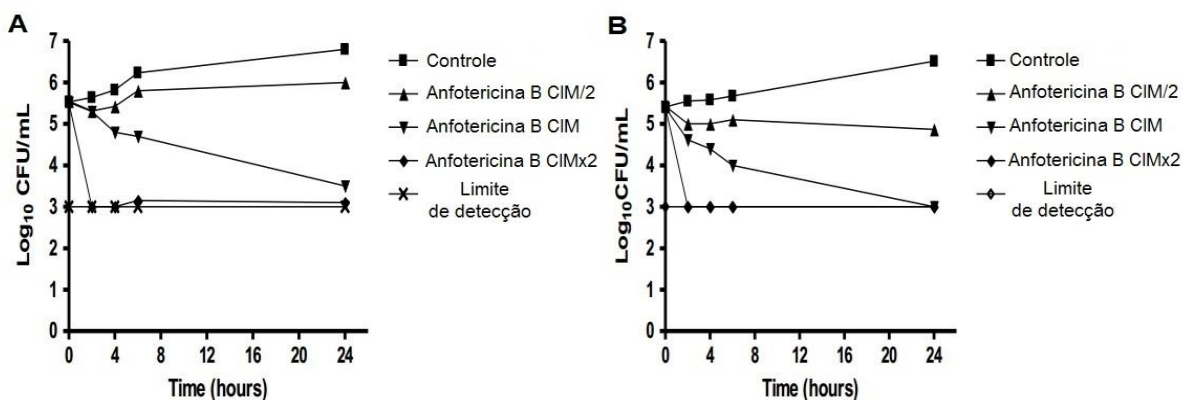
Zore et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes utilizando citral também sobre *C. albicans*, com relação a diminuição da viabilidade nas primeiras duas horas. Porém os autores verificaram efeito fungicida, à partir de duas horas, em uma concentração de 640 µg/mL, onde, no presente estudo, o efeito fungicida à partir de duas horas foi observado na CIMx2, e para a CIM, à partir de quatro horas.

Figura 8 - Efeito do geraniol na cinética de crescimento fúngico de *Candida albicans*: ATCC 76485 (A) e LM-70 (B).



As curvas de exposição ao geraniol, representadas na figura 8, mostram que a atividade fungicida para a cepa ATCC 76485 foi obtida a partir de duas horas com a CIMx2 e a partir de quatro horas para a cepa LM-70, também com a CIMx2.

Figura 9 - Efeito da Anfotericina B na cinética de crescimento fúngico de *Candida albicans*: ATCC 76485 (A) e LM-70 (B).



A ação da anfotericina B, representada nos gráficos da figura 9, mostrou atividade fungicida após vinte e quatro horas de exposição à CIM, e duas horas para a CIMx2, para as duas cepas testadas. Os resultados deste estudo confirmam os obtidos por Canton et al. (2004), onde a atividade fungicida da anfotericina B contra cepas de *C. albicans* se dava a partir de duas a quatro horas, em concentrações semelhantes.

Lima et al. (2005) utilizaram fitoconstituintes (citral, eugenol, α -pineno, β -pineno) contra leveduras patogênicas (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) e observaram efeito fungicida à partir de duas horas de exposição.

5.2 Efeito sobre a micromorfologia do fungo

Os resultados da análise da interferência dos produtos sobre a micromorfologia de *C. albicans* estão representados nas figuras 10 e 11, onde, A) é o controle da levedura, B) na presença do citral CIM, C) na presença do citral CIMx2 D) na presença do geraniol CIM, E) na presença do geraniol CIMx2, F) na presença da anfotericina B (antifúngico padrão). Como pode ser observado, as cepas testadas sofreram notáveis alterações micromorfológicas, visíveis por microscopia óptica.

A morfologia fúngica é um fator de grande importância para a invasão e virulência do fungo. A espécie *C. albicans* pode ser encontrada na forma leveduriforme ou filamentosa, fenômeno denominado de dimorfismo. Geralmente, a forma filamentosa está associada ao estabelecimento da doença e a invasão tecidual, enquanto a forma leveduriforme está associada ao estado comensal (ISHIDA, 2010).

Figura 10 - Efeito do citral, geraniol e anfotericina B sobre a micromorfologia de *C. albicans* ATCC 76485: **A)** Controle da levedura **B)** na presença do citral CIM **C)** na presença do citral CIMx2 **D)** na presença do geraniol CIM **E)** na presença do geraniol CIMx2 **F)** na presença da anfotericina B CIM. (400x).

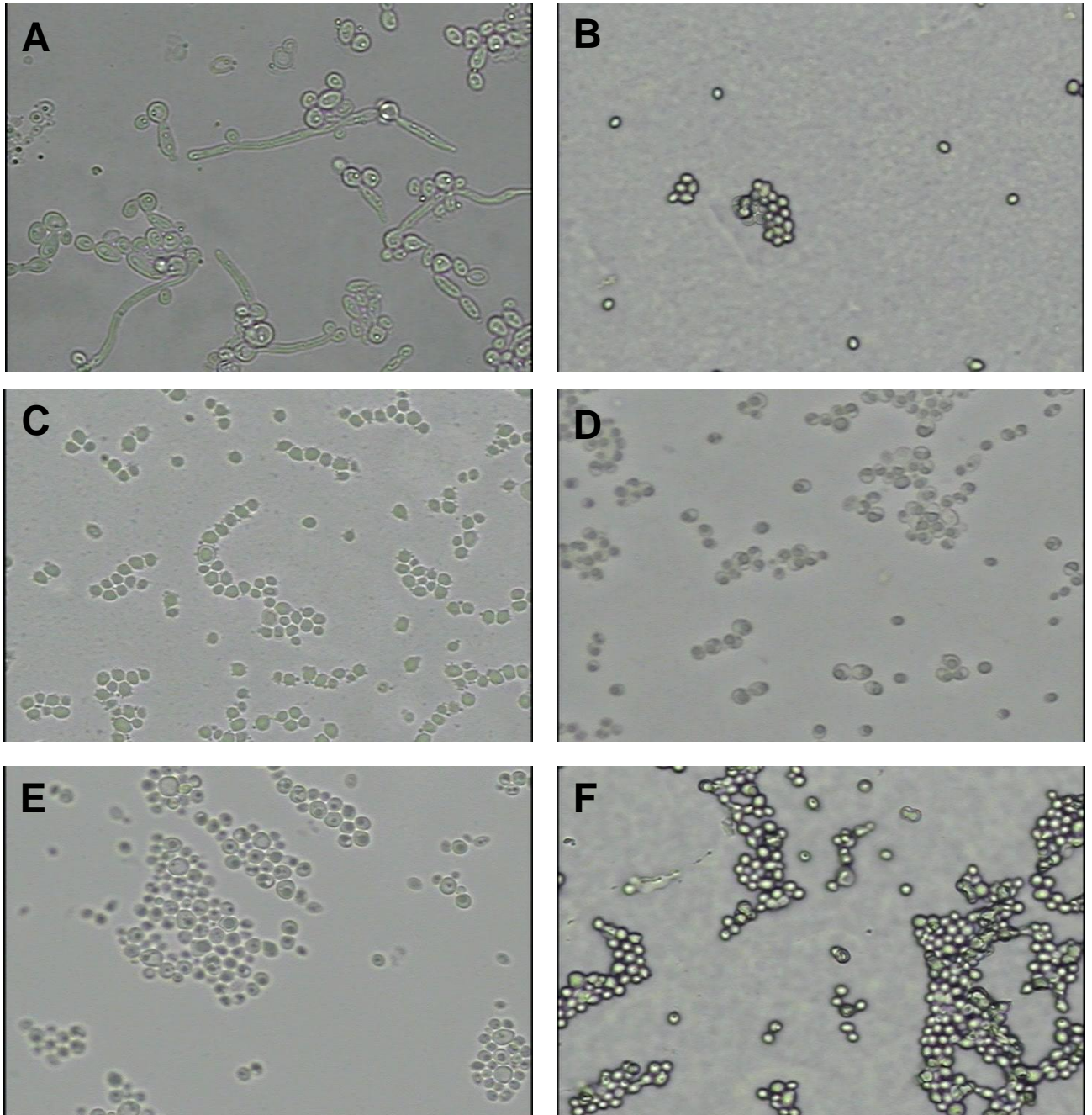
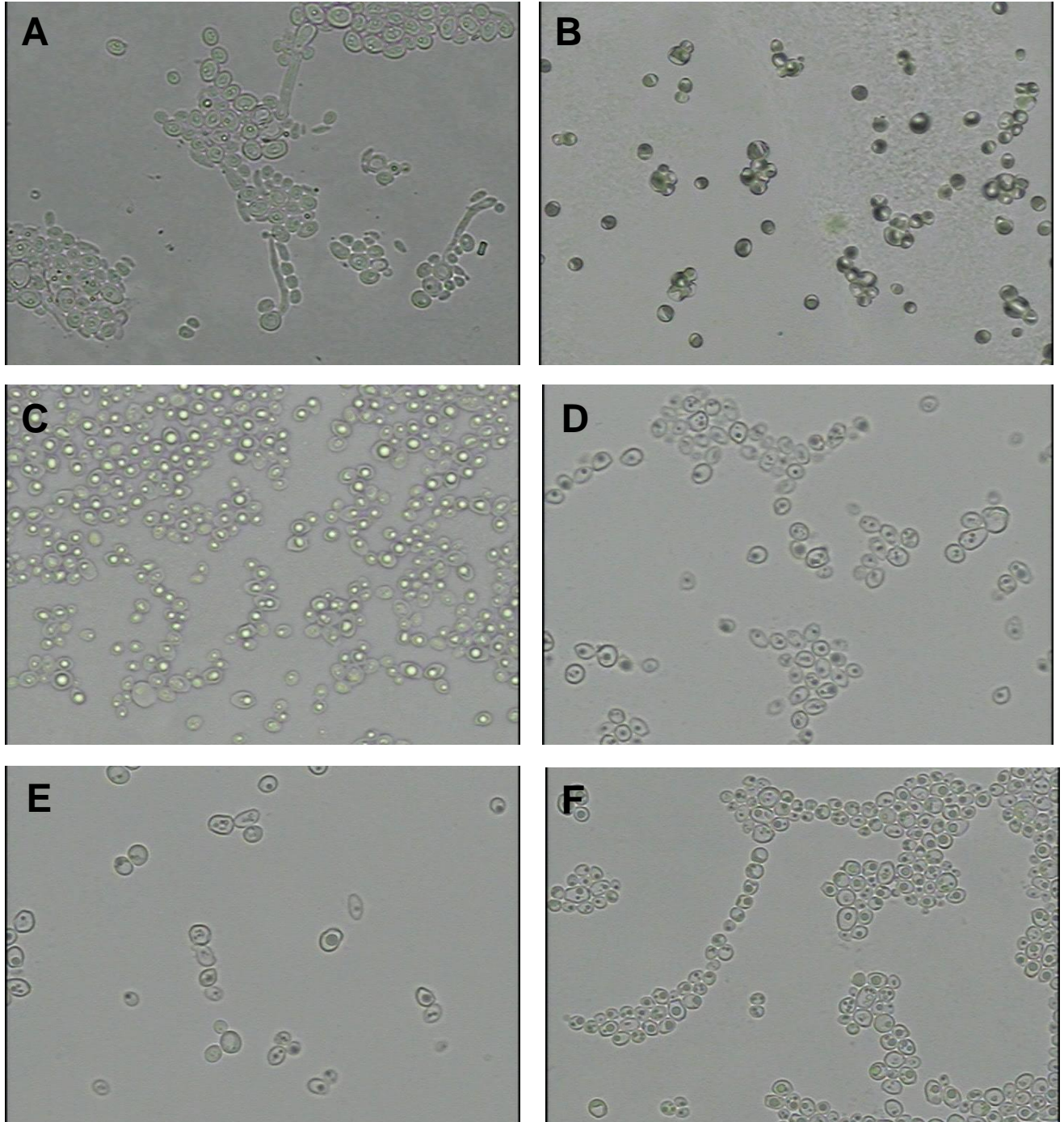


Figura 11 - Efeito do citral, geraniol e anfotericina B sobre a micromorfologia de *C. albicans* LM-70: **A)** Controle da levedura **B)** na presença do citral CIM **C)** na presença do citral CIMx2 **D)** na presença do geraniol CIM **E)** na presença do geraniol CIMx2 **F)** na presença da anfotericina B CIM. (400x).



Como pode ser observado nas figuras 10.A e 11.A, os ensaios de controle da levedura (sem adição de produtos teste), nas duas cepas testadas, apresentaram

crescimento fúngico normal, com formação de todas estruturas morfológicas de *C. albicans*: blastoconídios, pseudo-hifas e de clamidoconídios. Esses dados confirmam a viabilidade celular das amostras e sua capacidade normal de morfogênese. Tanto na presença dos fitoconstituintes quanto na presença da anfotericina B, não foi observada a formação de pseudo-hifas e clamidoconídios nas cepas testadas.

O óleo essencial de capim limão, rico em citral, é altamente eficaz contra *C. albicans*, causando alterações morfológicas em estruturas celulares e alterações da superfície celular (TYAGI, MALIK, 2010).

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- Os fitoconstituintes interferem na cinética de crescimento das cepas fúngicas estudadas, podendo apresentar efeito fungicida dependente do tempo de exposição e da concentração;
- Os fitoconstituintes utilizados no trabalho promoveram alterações micromorfológicas sobre *C. albicans*, inibindo o desenvolvimento de pseudo-hifas, importante fator de patogenicidade para estas leveduras, resultado semelhante ao que se observou com a anfotericina B, antifúngico padrão usado como controle positivo;
- Os fitoconstituintes utilizados neste trabalho possuem considerável potencial antifúngico contra cepas de *C. albicans*, sugerindo a realização de estudos posteriores mais aprofundados, acerca da toxicidade, mecanismos de ação e viabilidade de utilização, para uma possível avaliação clínica.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CEBALLOS, B. S. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; SANTOS FILHO, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.33, n.1, p.55-64, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BAL, A. M. The echinocandin: three useful choices or three too many? *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, p. 13-18, 2010.

BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F. A.; TOMAZ, A. C. A.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n.1, p. 141-148, 2007.

BENNETT, J. E. Agentes Antimicrobianos: Agentes Antifúngicos. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Editor: BRUNTON, L. L. Editores associados: LAZO, J. S.; PARKER, K. L. 11ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2006. cap. 48, p.1103-1118.

BORGOS, S. E. F.; TSAN, P.; SLETTA, H.; ELLINGSEN, T. E.; LANCELIN, J. M.; ZOTCHEV, S. B. Probing the structure–function relationship of polyene macrolides: engineered biosynthesis of soluble nystatin analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 49, n. 8, p. 2431–2439, 2006.

BURTON, G. R. W.; ENGELKIRK, P. G. **Microbiologia para as Ciências da Saúde**. 7ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

CALDERONE R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **TRENDS in Microbiology**. v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, n. 3, p. 457–465, 2011.

CHEN, A.; SOBEL, J. D. Emerging azole antifungals. **Expert Opinion on Emerging Drugs**. v. 10, n. 1, p. 21-33, 2005.

COLOMBO, A. L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 4, p.113-8, 2000.

COSTA, C. R. **Fatores de virulência de isolados de candida de pacientes imunocomprometidos. Caracterização molecular de Candida albicans suscetíveis e resistentes ao fluconazol**. 2009. 94 p. Tese (Dotourado em medicina tropical e saúde pública) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

DALMAU, L. M. Observations on mycological technique with particular references to pathogenic fungi. Porto Rico **Journal Public Heath Tropical Medicine**. v. 5, p. 302-311, 1929.

DIGNANI, M. C.; SLOMOKIN, J. S.; ANAÏSSIE, E. J. *Candida*. In: ANAÏSSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Clinical Mycology**. 2ª. Edição, Churchill Livingstone, Elsevier, 2009. p. 197-230.

DIGNANI, M. C.; SOLOMOKIN, J. S. ANAÏSSIE, E. *Candida*. In: ANAÏSSIE, E.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. (eds). **Medical Mycology**. 1ª Edição, Churchill Livingstone, Filadélfia, 2003. p. 195-239.

GIOLO, PADOVANI M.; SVIDZINSKI, ESTIVALET T. I. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 46, n. 3, 2010.

HASAN, F.; XESS, I.; WANG, X.; JAIN, N.; FRIES, B. C. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes Infection**. v. 11, n. 1-9, p. 753–761, 2009.

HENNEQUIN, C. Épidémiologie des mycoses invasives. L'expérience d'un centre hospitalo-universitaire parisien. **La Revue de Médecine Interne**, v. 17, p. 754-60, 1996.

ISHIDA, K. **Atividade antifúngica de diferentes inibidores da biossíntese de esteróis sobre isolados clínicos de Candida spp.: efeito sobre o crescimento, ultraestrutura, ciclo celular e perfil lipídico**. 2010. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

JIN, J.; GUO, N.; ZHANG, J.; DING, Y.; TANG, X.; LIANG, J.; LI, L.; DENG, X.; YU, L. The synergy of honokiol and fluconazole against clinical isolates of azole-resistant *Candida albicans*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 51, n. 3, p. 351–357, 2010.

KAUFFMAN, C. A. Fungal infections. **Proceedings of the American Thoracic Society**. v.3, p. 35-40, 2006.

KHAN, A.; AHMAD, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in Microbiology**. v. 161, n. 10, p. 816-823, 2010.

KLEPSE, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for standardized methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.42, n. 5, p. 1207–1212, 1998.

KLEPSE, M. E.; WOLFE, E. J.; JONES, R. N.; NIGHTINGALE, C. H.; PFALLER, M. A. Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Fluconazole and Amphotericin B Tested against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 6, p. 1392–1395, 1997.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. 9ª. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIMA, I. O; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; FARIAS, N. P.; NAVARRO, D. F.. Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 41, n. 2, 2005.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**. v. 28, n. 2, p. 178-184, 2010.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal brasileiro de pneumologia**. v. 32, n. 5, 2006.

MARTINS, J. S.; JUNQUEIRA, J. C.; FARIA, R. L.; SANTIAGO, N. F.; ROSSONI, R. D.; COLOMBO, C. E. D.; JORGE, A. O. C.. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**. v. 111, n. 1, p. 71-77, 2011.

MARTINS, I. M. C. L. B. Avaliação da ação antifúngica de citrus limon linn. frente a leveduras do gênero candida. 2009. 76p. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Bucal) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MATHEW, B. P.; NATH, M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. **ChemMedChem**. v. 4, n. 3, p. 310–23, 2009.

MIMICA, L. M. J. et al . Diagnóstico de infecção por Candida: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 45, n. 1, 2009.

MOHR, J.; JOHNSON, M.; COOPER, T.; LEWIS, J. S.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Current options in antifungal pharmacotherapy. **Pharmacotherapy**. v. 28, n. 5, p. 614–645, 2008.

MORAES, R. G. **Parasitologia & Micologia Humana**. MORAES, R. G.; LEITE, I. C.; GOULART, E. G. atualizada por BRAZIL, R. P. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara koogan, 2008. 608p.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Antifungal agents: Mechanism of action. **TRENDS in microbiology**, v. 11, p. 272-279. 2003.

PARRILHA, G. L.; SILVA, J. G.; GOUVEIA, L. F.; GASPAROTO, A. K.; DIAS, R. P.; ROCHA, W. R.; SANTOS, D. A.; SPEZIALI, N. L.; BERALDO, H. Pyridine-derived thiosemicarbazones and their tin(IV) complexes with antifungal activity against *Candida* spp. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, n. 5, p. 1473-1482, 2011.

PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. New and emerging treatments for fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 61, Suppl. 1, 2008.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. Cap. 4, p. 75-89.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. et al. **Farmacologia**. 6ª Edição, Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2007. Cap. 48, p. 692-697.

RAUTEMAA, R.; RICHARDSON, M.; PEALLER, M.; KOUKILA-KAKHOLÄ, P.; PERHEENTUPA, J.; SAXÉN, H. Decreased susceptibility of *Candida albicans* to azole antifungals: a complication of long-term treatment in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. London, v.60, n.4, p.889-892, 2007.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**. v. 11, p. 275-288, 2011.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 9, p. 3259–3266, 2008.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. cap. 5, p. 41-49.

SILVA, M. R.; OLIVEIRA Jr, J. G.; FERNANDES, O. F. L.; PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; SOUZA, L. K. H. et al. Antifungal activity of *Ocimum gratissimum* towards dermatophytes. **Mycoses**. v. 48, n. 3, p. 172–175, 2005.

SOUTHERN, P.; HORBUL, J.; MAHER, D.; DAVIS, D. A. *C. albicans* colonization of human mucosal surfaces. **PLoS One**. v. 3, n. 4, p. e2067, 2008.

TYAGI, A. K.; MALIK A. In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapour phase against *Candida albicans*. **Micron**. v. 41, n. 7, p. 797-805, 2010.

USTULIN, M.; FIGUEIREDO, B. B.; TREMEA, C.; POTT, A.; POTT, V. J.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande-MS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, n. 3, p. 805-813, 2009.

WILSON, D. T.; DREW, R. H.; PERFECT, J. R. Antifungal therapy for invasive fungal diseases in allogeneic stem cell transplant recipients: an update. **Mycopathologia**. v. 168, n. 6, p. 313–27, 2009.

ZORE, G. B.; THAKRE, A. D.; JADHAV, S.; KARUPPAYIL, S. M. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**. v. 15, n. 18, p. 1181-1190, 2011.

